

平成21年 5月 14日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390472

研究課題名（和文） 骨吸収抑制ペプチドを徐放するナノゲルを臨床応用する為の検討

研究課題名（英文） Development of peptide-delivery system using nanogel carrier for the control release of the peptide as the inhibitor of bone resorption toward clinical applications

研究代表者

青木 和広 (AOKI KAZUHIRO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教（現在准教授）

研究者番号：40272603

**研究成果の概要：**ポストゲノム時代において、タンパク質の結晶構造解析情報をもとにペプチド薬を設計する機会が増えてきている。ところが、ペプチド自体、易分解性であり、安定性に欠け、実際の臨床応用に際して障害が多い。我々はペプチド薬の臨床応用のために、骨破壊を抑制する W9 ペプチドを用い、ペプチド薬をコントロールリリースできる担体を検討した。本研究により、ペプチドの担体として、コレステロールとプルランとの合成体である CHP ナノゲルがペプチドの担体として使用できる性質を持ち合わせていることを明らかにできた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
年度			
総計	10,400,000	3,120,000	13,520,000

研究分野：機能系歯科学

科研費の分科・細目：歯科薬理学

キーワード：骨吸収抑制ペプチド、ナノゲル、薬物送達システム、徐放ゲル、低カルシウム食飼育、マウス、破骨細胞

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、分子量 10 万以上の抗体製剤など分子量の大きな生物学的製剤の問題点を解決するために設計された WP9QY ペプチド（以下 W9 ペプチド）に注目し、この 10 年間、開発を続けてきた。このペプチドは腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) のアンタゴニスト（拮抗薬）として TNF  $\beta$  とその受容体 TNF 1 型受容体との複合体結晶構造解析情報、抗 TNF  $\alpha$  抗体構造情報などを基にコンピューター上で設計されたアミノ酸 9 つで構成された環状ペプチドである。

薬物開発の原型となるリード化合物を探すために、ターゲットとなるタンパク質の結晶構造解析情報から薬を設計する手法は SBDD (Structure-based drug design) 法と呼ばれ、ループ構造などタンパク質の 3 次元構造を模倣しやすいペプチドが薬の候補として多く設計されている。しかしながら W9 ペプチドも含め、ペプチド製剤は生体内の酵素により分解を受けやすく、また凝集塊をつくりやすい性質を持ち、臨床応用される際、安定性に欠ける。このことが、設計されたペプチドの臨床応用を断念せざるを得ない大

きな理由となっている。

我々は、W9 ペプチドの骨吸収抑制効果を様々な骨吸収誘導実験モデルを用いて明らかにしてきた。実験を始めた当初、W9 ペプチドは低カルシウム食飼育によって引き起こされる骨吸収を1日8回3時間おきに皮下投与して初めて骨吸収を抑制できることを明らかにした。その時用いた W9 ペプチドの1回の投与量は 9 mg/kg および 24 mg/kg であり、9 mg/kg の1回投与量でも骨吸収が抑制された (Aoki et al J Clin Invest 116:1525-1534, 2006)。

その後の我々の実験は、3時間おきに投与することが困難となる投与期間3週間にわたる関節リウマチモデルにおける W9 ペプチドの骨吸収抑制効果を検討するため、ペプチドを徐放する浸透圧ポンプを皮下に埋入して W9 ペプチドの投与を始めた。すると、3時間ごとの投与量と比べて一日あたり 18 分の 1 のペプチド量で骨吸収抑制効果を発揮することが明らかとなった。すなわち、ペプチドは徐放されれば、4 mg/kg/day という低用量で現在関節リウマチの特効薬である抗 TNF $\alpha$  抗体と同様もしくはそれ以上の骨吸収抑制効果を発揮することが明らかとなり、炎症の抑制効果も発揮することを示すことができた (Saito et al Arthritis Rheum. 56:1164-1174, 2007)。しかしながら、浸透圧ポンプを皮下に埋めて患者に用いることができないため、W9 ペプチドの臨床応用のためには、浸透圧ポンプに代わるペプチド薬を徐放する薬物担体の開発が必須となる。

本学生体材料工学研究所、有機材料学分野の秋吉一成教授は、ナノゲル工学を応用した薬物担体の開発を行ってきている。すでに、タンパク質の徐放効果を確かめていたコレステロールをプルランに置換した合成ナノゲル (CHP ナノゲル) が、ペプチド薬を徐放する担体として働くことを期待し、同分野の森本助教 (現 東北大准教授) とともに実験を始めることにした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症性骨吸収を抑制する W9 ペプチドの臨床応用を実現するため、CHP ナノゲルをペプチドの担体として用いることにより、ペプチドの安定性を増し、浸透圧ポンプを用いなくても、骨吸収抑制効果を発揮するか否かを明らかにすることにある。

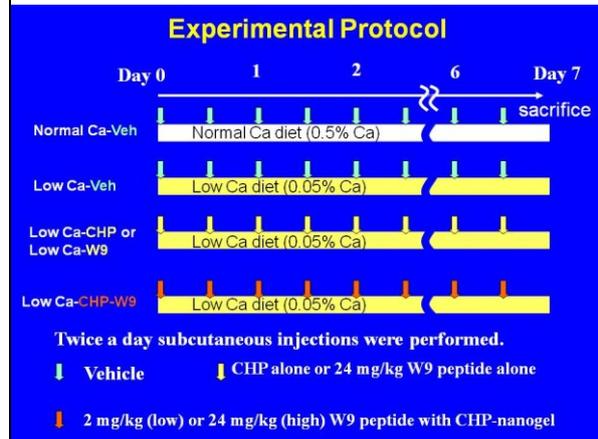
## 3. 研究の方法

### (1) 低カルシウム食飼育マウスモデル

用いる実験モデルは、我々が常に用いてきた骨吸収誘導モデルである低カルシウム食飼育による骨吸収実験モデルである。

42 匹の 5 週令雄性 C57BL/6J マウスを用いた。0.5 %カルシウムを含む正常カルシウム

食および、その 10 分の 1 量のカルシウムを含む低カルシウム食を Amano の方法に従い、練りえさを作製、冷凍保存。必要時に解凍し、マウスの体重に合わせて、正常カルシウム食、低カルシウム食を同量量り分けて与えた。動物は、マウス用のメタボリケージを用いて個別に飼育、毎日尿を採取し、3日間正常カルシウム食を与える馴化期間ののち、以下のようにマウスを 6 群に分けて実験を行った (n=4)。



1. 正常カルシウム食+溶媒投与群
2. 低カルシウム食+溶媒投与群
3. 低カルシウム食+CHP ナノゲル投与群
4. 低カルシウム食+W9 ペプチド投与群
5. 低カルシウム食+W9 ペプチド (4 mg/kg/day) /CHP ナノゲル複合体投与群
6. 低カルシウム食+W9 ペプチド (48 mg/kg/day) /CHP ナノゲル複合体投与群

なお、マウスへの薬物もしくは溶媒などの投与は夜9時と朝9時の1日2回皮下投与し、正常カルシウム食と低カルシウム食とを分け始めてから7日目に塩酸メドミジンにより鎮静、鎮痛を行った上で頸骨脱臼により屠殺した。

### (2) X線学的骨の解析

屠殺後、脛骨、大腿骨を取り出し、3日間ホルマリンを主剤とした固定液に4℃で浸漬、その後PBSにて一晚洗浄。軟組織を丁寧に除去したのち、軟X線写真による観察、マイクロCTによる3次元的骨形態の把握、並びにpQCT (末梢骨用定量的CT)を用いた骨密度測定を行った。

### (3) 骨形態計測学的解析

X線学的解析終了後、脛骨を適法によりGMA/MMAの混合樹脂に包埋。厚さ5ミクロンの切片を切り出し、染色後、骨形態計測を行った。

### (4) 統計

統計学的解析はANOVAによる分散分析により、 $p < 0.05$ で差があると判断された場合、群間の比較はFisher' PLSD *posthoc* テストを用いて行った。なお、すべての *in vivo* 動物実験の定量解析結果は、ボックスプロット（箱ひげグラフ）を用いて表示し、サンプルの中央値（真ん中二つの平均値）およびサンプルのばらつき度合いを明らかにした。

(5) CHP ナノゲルによる W9 ペプチドの凝集形成抑制効果の判定

*In vitro* では、CHP ナノゲルの粒子の大きさ、W9 ペプチドの粒子の大きさ、および CHP ナノゲル/W9 ペプチド複合体の粒子の大きさを動的散乱（dynamic light scattering (DLS)）装置を用いて測定した。

4. 研究成果（図はすべて European Journal of Pharmaceutical Sciences Vol 37, Issue 2, 83-88, 2009 および online materials より引用）

(1) CHP ナノゲルとの複合体形成により W9 ペプチドの凝集は解消された。

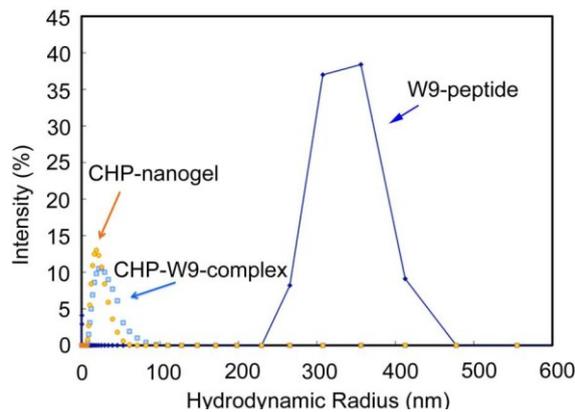


図 1 DLS 装置による粒子径の測定結果

複合体形成により、W9 ペプチドの粒子サイズは CHP ナノゲルと同サイズになり、W9 ペプチドは完全にナノゲル内に溶け込んだ（図 1）。

(2) CHP ナノゲル/W9 ペプチド複合体投与により、低カルシウム食飼育による骨量低下、骨密度低下および海綿骨構造の連結性低下が抑制された。

凝集塊を作らなくなった W9 ペプチドと CHP ナノゲルとの複合体を皮下に投与することにより、浸透圧ポンプを用いずとも、低カルシウム食飼育により引き起こされる骨吸収を抑制できるか否かを検討した。

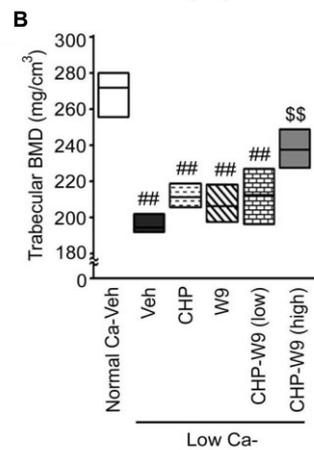
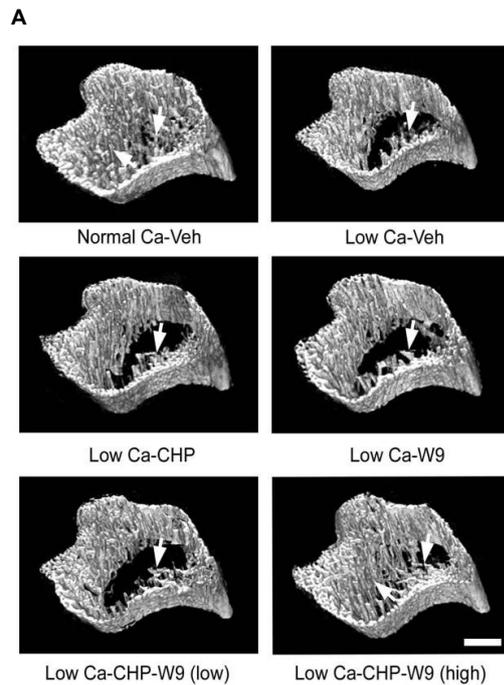


図 2 脛骨海綿骨部の X 線学的解析結果

まず図 2A のマイクロ CT 像で示す様に、低カルシウム (Low Ca) 食飼育 + 溶媒 (Veh) 投与群では、正常カルシウム

(Normal Ca) 食飼育 + 溶媒投与群に比べて、脛骨 2 次海綿骨部の骨量（白矢印）の減少が認められた。CHP ナノゲルや W9 単身の投与では減少した骨量は回復していないようだが、CHP ナノゲルと 48 mg/kg/day W9 ペプチドとの複合体 (Low Ca-CHP-W9 (high)) 投与により、回復が認められた。骨密度解析の結果はマイクロ CT の所見を支持していた (図 2B)。W9 ペプチドが用量依存的に低カルシウム食により減少した骨密度を回復しているような定量結果だが、低カルシウム食 + 溶媒投与群と比べて低用量 (4 mg/kg/day) の W9 投与では有意な骨密度の回復は認められなかった (図 2B)。

非脱灰組織切片を作成し、石灰化障害などの原因で骨密度が減少しているのか、海綿骨構造は実際どのように変化したのか、さらに、骨密度の減少は破骨細胞の増加によりなされ、その回復が破骨細胞数の抑制によりなされたものであるか否

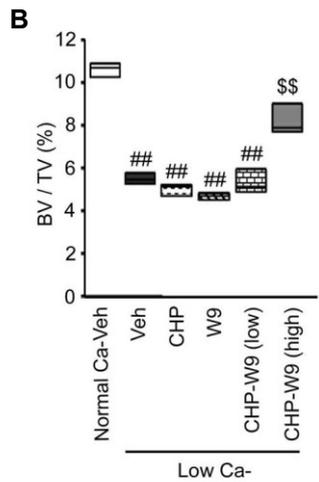
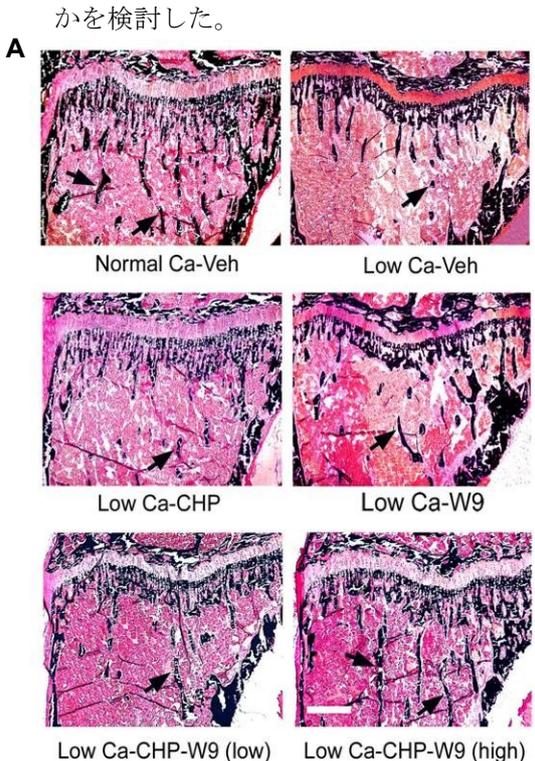


図3 非脱灰切片による骨量解析結果

(3) CHP ナノゲル/ W9 ペプチド複合体投与により低カルシウム食飼育による破骨細胞増加が抑制された。

図4の組織所見およびその定量解析結

図3Aに示すように、石灰化組織を黒く染めるフォンコッサ染色の組織所見から、低カルシウム食飼育により骨密度が減少したことは石灰化不全によるものではなく、骨量自体が減少した結果であることが示唆された。黒色で示された石灰化組織は、低カルシウム食飼育により減少しており、海綿骨部（黒矢印）所見により骨密度計測の解析結果を確かめることができた。詳細は Alles 論文（雑誌論文6番）で示しているが、低カルシウム食飼育による海綿骨部の微細構造の破壊を CHP/W9 ペプチド複合体投与により抑制したことが示された（図3）。

果に示すように、低カルシウム食飼育による海綿骨部の骨量減少は、破骨細胞数の増加により引き起こされる。このことは、我々が発表した過去の多くの論文にも示されている。この破骨細胞の増加を CHP/W9 ペプチド複合体投与により抑制したことが定量的に示された（図4B、C）。

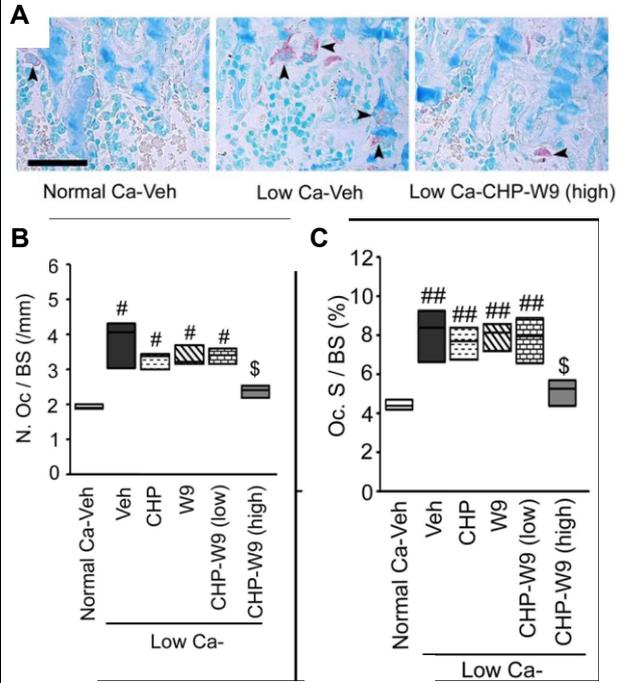


図4 CHP/W9 ペプチド複合体投与による破骨細胞数(B)および面(C)の変化

(4) CHP ナノゲル/W9 ペプチド複合体投与により低カルシウム食飼育による尿中骨吸収マーカーの上昇が抑制された。

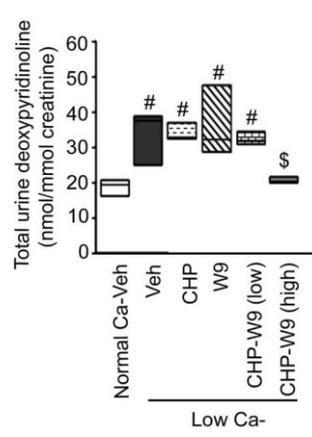


図5 尿中骨吸収マーカーの変化

実際、数えた破骨細胞が骨の構成要素の一つである1型コラーゲンの分解産物であるデオキシピリジノリンの尿中濃度を測定することにより、機能的な破骨細胞が変化したか否かを検討。図5で示すように破骨細胞が骨を吸収した量を反映する骨吸収マーカーの変化は、図4で示した破骨細胞の数(4B)や破骨細胞の占める骨面の割合(4C)と

同じ変化を示し、低カルシウム食飼育により亢進した骨吸収を CHP/W9 ペプチド複合体投与によりブロックできたことが示された。

#### (5) この研究課題に関するその他の研究成果

CHP ナノゲルがペプチド薬の良い薬物担体として、ペプチドの凝集を防ぎ、皮下投与により骨吸収を抑制することが明らかとなった。W9 ペプチド単身では、3 時間ごとに投与してようやく骨吸収抑制効果が発揮されたが、今回の実験では 12 時間ごとに投与すれば同様な骨吸収抑制効果が発揮されることが明らかとなった。現在、さらに使用するナノゲルをスクリーニングし、10mg/kg/day のペプチドを一度投与すれば、同様な骨吸収モデルを用いて骨吸収抑制効果を示すことが明らかとなっている (unpublished data)。ペプチド薬の将来に希望を感じる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件) (すべて査読あり)

1. Saito H, Kojima T, Takahashi M, Horne WC, Baron R, Amagasa T, Ohya K, Aoki K. A tumor necrosis factor receptor loop peptide mimic inhibits bone destruction to the same extent as anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody in murine collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum.** 56:1164-1174, 2007.
2. Gil-Henn H, Destaing O, Sims NA, Aoki K, Alles N, Neff L, Sanjay A, Bruzzaniti A, De Camilli P, Baron R, Schlessinger J. Defective microtubule-dependent podosome organization in osteoclasts leads to increased bone density in Pyk2(-/-) mice. **J Cell Biol.** 178:1053-1064, 2007.
3. Kubota T, Hoshino M, Aoki K, Ohya K, Komano Y, Nanki T, Miyasaka N, Umezawa K. NF- $\kappa$ B inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin(D HMEQ) suppresses osteoclastogenesis and expression of NFATc1 in mouse arthritis without affecting expression of RANKL, OPG or M-CSF. **Arthritis Res Ther.** 9 : R97, 2007.
4. Asagiri M, Hirai T, Kunigami T, Kamano S, Gober H-J, Okamoto K, Nishikawa K, Latz E, Golenbock D.T, Aoki K, Ohya K, Imai Y, Morishita Y,

Miyazono K, Kato S, Saftig P, Takayanagi H. Cathepsin K-Dependent Toll-Like Receptor 9 Signaling Revealed in Experimental Arthritis. **Science** Vol.319, pp.624-627, February 2008

5. Mian MD, Saito H, Alles N, Shimokawa H, Aoki K, Ohya K. Lipopolysaccharide-induced bone resorption is increased in TNF type 2 receptor-deficient mice in vivo. **J Bone Miner Metab** Vol.26, pp469-477, 2008. (Corresponding author)
6. Alles, N., Soysa, N. S., Hussain, M. D., Tomomatsu, N., Saito, H., Baron, R., Morimoto, N., Aoki, K., Akiyoshi, K., Ohya, K. Polysaccharide nanogel delivery of a TNF-alpha and RANKL antagonist peptide allows systemic prevention of bone loss. **Eur J Pharm Sci** : 37 (2) , 83-88, 2009. (Corresponding author)
7. Tomomatsu, N., Aoki, K., Alles, N., Soysa, N. S., Hussain, A., Nakachi, H., Kita, S., Shimokawa, H., Ohya, K., Amagasa, T. LPS-Induced Inhibition of Osteogenesis is TNF- $\alpha$ -Dependent in a Murine Tooth Extraction Model. **J Bone Miner Res** online publication (Corresponding author)
8. Soysa, N. S., Alles, N., Shimokawa, H., Jimi, E., Aoki, K., Ohya, K. Inhibition of the classical NF-kappaB pathway prevents osteoclast bone-resorbing activity **J Bone Miner Metab** 27(2), 131-9, 2009 (Corresponding author)
9. Sriarj, W., Aoki, K., Ohya, K., Takagi, Y., Shimokawa, H. Bovine dentine organic matrix down-regulates osteoclast activity. **J Bone Miner Metab** 27(3), 315-23, 2009.

[学会発表] (計 8 件)

1. Alles N, Soysa N, Mian H, 青木和広, 大谷啓一. Application of CHP Nanogel as a drug delivery system for tumor necrosis factor- $\alpha$  peptide antagonist in murine bone resorption model. 第 27 回日本骨形態計測学会 The 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Bone Morphometry, 長崎, 2007 年 5 月.
2. Alles N, Mian H, Soysa N, Saito H, Aoki K, Akiyoshi K, Ohya K. Use of Nanogels as a Drug Delivery System

- for Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Antagonist in Murine Bone Resorption Model. ASBMR 29<sup>th</sup> Annual Meeting, Honolulu, September 2007.
3. **青木和広**, 齋藤広章, Baron R, 大谷啓一. TNF アンタゴニストによる骨吸収阻害. 第 35 回薬物活性シンポジウム, 広島, 2007 年 11 月 29 日～30 日.
  4. **Aoki K**, Ohya K. Drug development for inflammatory bone disease. The 81<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (第 81 回日本薬理学会年会), 2008 年 3 月 17～19 日, 横浜
  5. Alles N, Soysa N, Mian MD, Tomomatsu N, **Morimoto N**, Hasegawa U, Sawada S, Tada Y, Akiyoshi K, Ohya K, **Aoki K**. Nanogel Cross-linking Hydrogel as a Drug Delivery System for Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Antagonist. 30<sup>th</sup> ASBMR Annual Meeting, 2008 年 9 月 12～16 日, Montreal
  6. Alles N, Soysa N, **青木和広**, 大谷啓一. Nanogel cross-linking hydrogel as a drug delivery system for the peptide type of drugs. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2008 年 9 月 23 日～25 日, 東京
  7. **青木和広**, Alles N, Soysa N, 自見英治郎, 下川仁彌太, 大谷啓一. 破骨細胞機能抑制ペプチドによる臨床応用の可能性. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2008 年 9 月 23 日～25 日, 東京
  8. **青木和広**. ライオン学術賞受賞講演「ペプチド創薬の炎症性骨吸収疾患に対する応用と将来への展望」. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2008 年 9 月 23 日～25 日, 東京

[図書] (計 1 件)

1. **青木和広**, 大谷啓一. 腫瘍壊死因子中和療法の新しい展開—WP9QY ペプチドによる治療の可能性—. 日本歯科評論 (The Nippon Dental Review), 67(7):170-172, 2007.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

この研究成果を含めたペプチド薬の一連の研究が評価され、第 50 回歯科基礎医学会学術大会において第 8 回ライオン学術賞を受賞した。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 和広 (AOKI KAZUHIRO)

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 助教

研究者番号 : 40272603

(2) 研究分担者

森本 展行 (MORIMOTO NOBUYUKI)

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 助教

研究者番号 : 00313263

(3) 連携研究者

Roland Baron

Harvard 大歯学部 教授

(4) 研究協力者

大谷 啓一 (OHYA KEIICHI)

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授

秋吉 一成 (AKIYOSHI KAZUNARI)

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授

下川 仁彌太 (SHIMOKAWA HITOYATA)

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 前准教授

多田 陽子 (TADA YOKO)

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 修士課程修了

下田 麻子 (SHIMODA ASAKO)

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 博士課程在学中

齋藤 広章 (SAITO HIROAKI)

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 非常勤講師 現在 Harvard 大歯学部 博士研究員

MD Anower Hussain Mian

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 博士課程修了

Niroshani Soysa

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 博士研究員

Neil Alles

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 博士課程在学中

その他、多くの研究者、本学職員、大学院生によってこの研究は支えられた。

ここに心から感謝の意を表する。